

ヒト精子染色体に及ぼすマイクロ波照射の影響¹⁾

上口勇次郎*・立野裕幸*・渡邊誠二*・外村泰子

(Received January 9, 1995)

放射線や化学物質などの環境変異原の遺伝的影響を評価する上で、染色体異常誘発の有無がよい指標の一つになるということはよく知られている。マイクロ波が染色体異常を誘発するか否かに関してもこれまで数多く研究がなされているが、必ずしも明確な結論が得られていない。

マイクロ波による染色体異常誘発を否定する結果はチャイニーズハムスターのリンパ球 (Huang *et al.*, 1977), マウスの骨髓細胞 (McRee and MacNichols, 1981), ヒトのリンパ球 (Lloyd *et al.*, 1984) などで報告されている。

これに対して、肯定的な結果はヒトのリンパ球 (Baranski *et al.*, 1969; Garaj-Vrhovac *et al.*, 1987), カンガルーラットの体細胞 (Yao and Jiles, 1970), チャイニーズハムスターの体細胞 (Alam *et al.*, 1978; Garaj-Vrhovac *et al.*, 1991) などで報告されている。また、ごく最近、DNA の塩基配列を直接解析した研究から、マイクロ波が突然変異を誘発するという可能性が示唆されている (Sarkar *et al.*, 1994)。しかしながら、これらの肯定的研究においても、マイクロ波の作用が DNA に対する直接的な作用なのか、あるいは照射に伴う温度上昇による間接的作用 (温度効果) なのかに関しては議論が分れている。

上記の研究はいずれも体細胞に及ぼす影響を調査したものであり、子孫に及ぼす遺伝的影響を知るためには生殖細胞を用いた研究が必要である。ヒト生殖細胞に及ぼす影響に関しては、2.45 GHz のマイクロ波を 30 分照射することによって精子数の減少が起こること (Fang *et al.*, 1982), および精母細胞がマイクロ波に対して最も高感受性であり、続いて精細胞、精原細胞の順に影響を受けやすいこと (Lebovitz *et al.*, 1987) などが報告されている。しかし、生殖細胞の染色体に及ぼす影響を調査した報告はいまだない。

そこで今回、われわれはヒト精子に *in vitro* でマイクロ波を照射し、染色体異常が誘発されるか否かを調査する実験を計画した。この実験系は従来の研究にはない次のような利点をもっている。(1) マイクロ波の子孫に及ぼす影響をヒトの生殖細胞で直接検討できる。(2) 精子は体細胞や卵子よりも環境変異原の影響 (染色体異常誘発能) に対して敏感である (Kamiguchi *et al.*, 1990a, b, 1994b)。その主な理由の一つは、精子が変異原によって生じた DNA 損傷を修復する能力をもっていないという点にある。したがって、もしマイクロ波が染色体異常の原因になる DNA 損傷を誘発するとすれば、それは精子を用いた系で鋭敏にとらえられると考えられる。(3) 精子は細胞質をもっていない (細胞としての活性が休止している) ので、熱ショック応答など細胞質内代謝活性の変化を介したマイクロ

¹⁾ 本研究は文部省科学研究費補助金 (外村: 一般研究 C, 課題番号 06680517) の援助を受けたものである。

* 旭川医科大学医学部

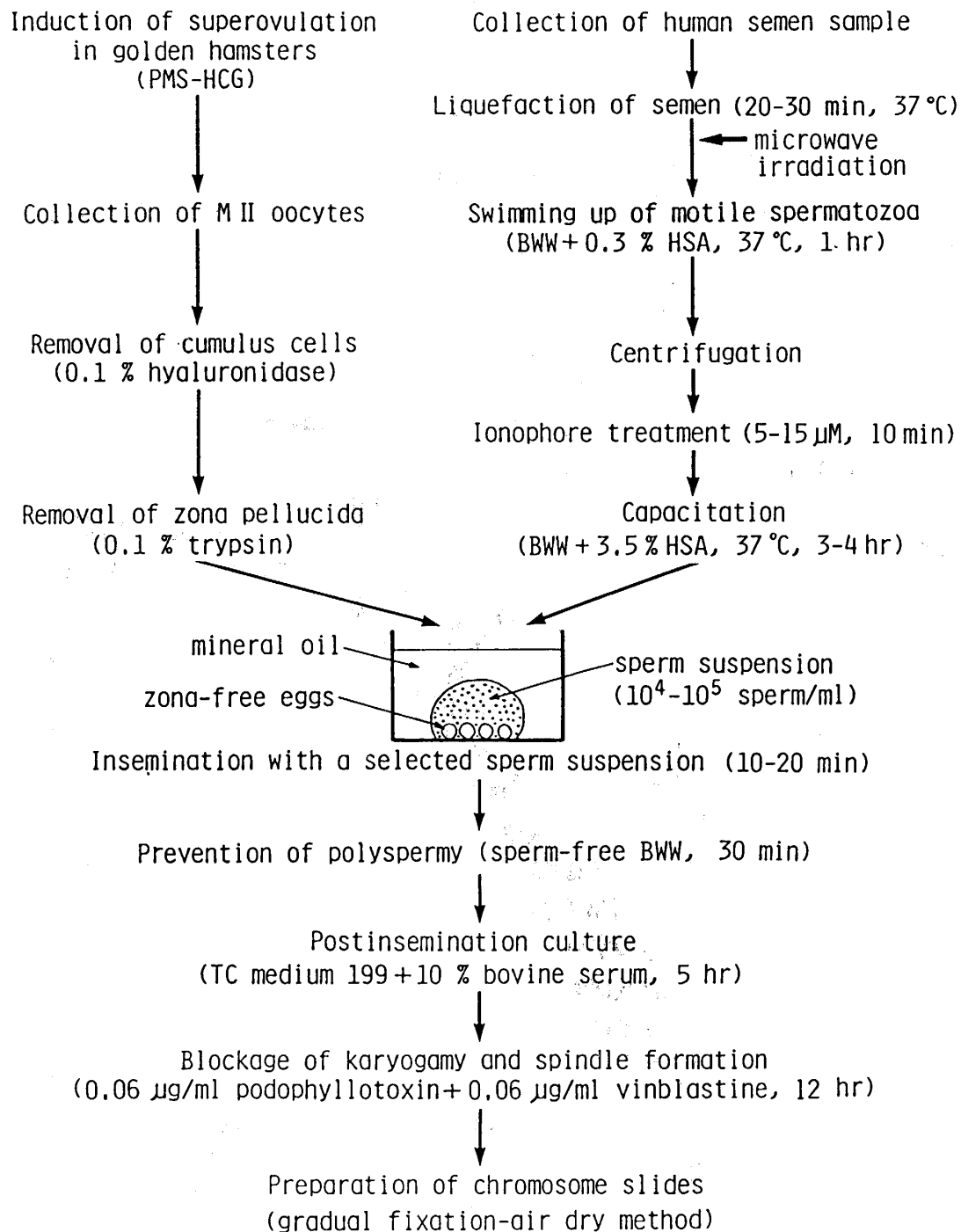


Fig. 1. Summary of the procedure for preparing human sperm chromosome slides using interspecific *in vitro* fertilization with zona-free golden hamster oocytes.

波の影響（間接的影響）を除外して考えることができる。すなわち、もしマイクロ波の影響が認められれば、それは DNA に対する直接作用である可能性が強い。今回の研究は以上のような実験系の特性を活かして行われた。

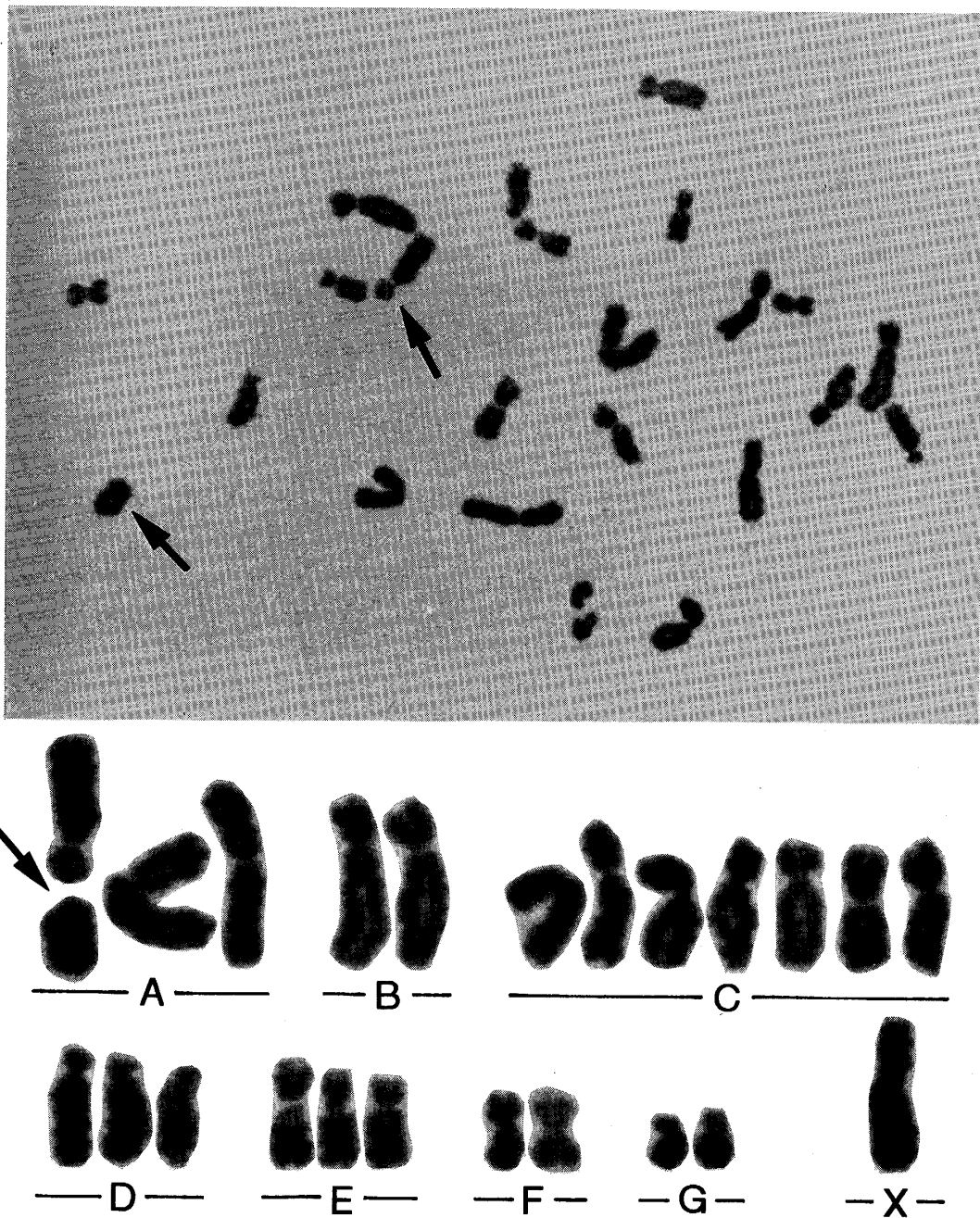


Fig. 2. A chromosome complement derived from a human spermatozoon exposed to microwaves for 10 seconds and its karyotype, showing a breakage of chromosome 1 (arrows).

材料と方法

健常男性 3 名から得られた精液試料が実験に用いられた。これらの精液提供者は精子数、運動能、奇形率などの点で正常の精液所見を示し、精液採取の 3 ヶ月前までに診断・治療用の放射線照射あるいは医薬品の投与を受けた者は含まれていない。

実験手順の概略は Fig. 1 に示されている。各精液試料を液化させた (37°C, 20 分) 後

に、約3倍量のBWW液(ヒト精子用培養液, 37℃)で希釈・遠心して精漿を取り除いた。沈澱した精子ペレットを二分し、それぞれに2 mlのBWW液を加えて精子を再懸濁させた。一方の精子懸濁液を電子レンジ(日立MR-M220, 2.45 GHz, 500 W)に入れ、5秒あるいは10秒間マイクロ波を照射した。照射後の温度上昇をできるだけ抑えるために、精子懸濁液の温度を約30℃まで下げてから照射を行った。もう一方の精子懸濁液は非照射の対照群とした。精液試料毎に実験群と対照群を設定したが、これは精子染色体異常の自然発生率に著しい個人差がみられるからである(Kamiguchi *et al.*, 1994a)。照射後、直ちに精子懸濁液の温度変化を微小先端デジタル温度計で測定するとともに、懸濁液を一滴スライドグラスにとって顕微鏡下で精子の運動率を測定した。

実験群および対照群の精子懸濁液から精子浮遊法によって運動能の高い精子のみを回収し、われわれの開発した方法に従って(Kamiguchi and Mikamo, 1986)受精能獲得処理(Ca-ionophore 処理および3.5% ヒト血清アルブミンを含むBWW液による培養)を施した。一方、ホルモン処理により過排卵を誘発したゴールデンハムスター雌から未受精卵を採取し、卵丘細胞と透明帯を除去した後にヒト精子と異種間体外受精させた。TCM 199液を用いて受精卵を第1卵割中期まで培養した後、漸進固定・空気乾燥法(Mikamo and Kamiguchi, 1983)を用いて染色体標本化し(Fig. 2)、ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率を調査した。

結果および考察

1. 照射に伴う液温および精子運動率の変化

Table 1 に示す通り、マイクロ波5秒照射群では精子懸濁液の温度上昇幅は7-11℃と比較的少なく、精子運動率の低下もわずかであった。一方、10秒照射群では、懸濁液の温度が52-56℃まで上昇し、精子運動率も40-50%にまで低下した。しかし、生存した精子は受精能力を失っておらず、対照群よりはやや受精率が低かったものの、十分な数の精子を染色体分析することができた。予備実験では15秒および20秒の照射も行ったが、いずれの場合も精子生存率が著しく低下し、体外受精実験を成功させることができなかった。すなわち、10秒がこの実験における照射時間の限界と考えられた。

Table 1. Changes in the motility of human spermatozoa and the temperature of sperm suspension immediately after microwave irradiation

Donors	Control		5-second irradiation		10-second irradiation	
	Motility (%)	Temp. (°C)	Motility (%)	Temp. (°C)	Motility (%)	Temp. (°C)
A	80-90	29	80-90	38	40-50	55
B	60-70	28	50-60	35	40-50	52
C	80-90	30	70-80	41	40-50	56

2. 精子染色体に及ぼすマイクロ波の影響

実験は3個体について行われ、対照群で合計474精子、5秒照射群で386精子、10秒照射群で506精子が染色体分析された(Table 2)。

Table 2. Effects of microwave irradiation on human sperm chromosomes

Experimental groups	Donors	No. of sperm analyzed	No. of sperm with structural chromosome aberrations (%)	No. of aberrations (per spermatozoon)
Control	A	164	17 (10.4)	19 (0.116)
	B	128	13 (10.2)	17 (0.133)
	C	182	24 (13.2)	31 (0.170)
	Total	474	54 (11.3±1.4)	67 (0.140±0.023)
5-second irradiation	A	103	13 (12.6)	15 (0.147)
	B	86	8 (9.3)	8 (0.093)
	C	197	25 (12.7)	28 (0.142)
	Total	386	46 (11.5±1.6)	51 (0.127±0.024)
10-second irradiation	A	133	11 (8.3)	13 (0.098)
	B	157	15 (9.6)	17 (0.108)
	C	216	28 (13.0)	35 (0.162)
	Total	506	54 (10.3±2.0)	65 (0.123±0.028)

構造的染色体異常をもつ精子の出現率は対照群 $11.3 \pm 1.4\%$ 、5 秒照射群 $11.5 \pm 1.6\%$ 、10 秒照射群 $10.3 \pm 2.0\%$ で、3 群の異常率の間に統計的有意差はなかった。また、精子当たりの染色体異常出現率は 3 群でそれぞれ 0.140 ± 0.023 、 0.127 ± 0.024 、 0.123 ± 0.028 であり、やはり有意差を示さなかった。出現した構造異常のタイプは切断、染色体断片、欠失、ギャップおよび転座で、これらの異常には染色体型異常と染色体分型異常の両方が含まれていた。しかし、特定のタイプの構造異常が照射群で増加する傾向も認められなかった。

今回、精子の運動率にかなりのダメージを与える厳しい照射条件を設定したにもかかわらず、精子染色体異常の増加は認められなかった。したがって、マイクロ波は成熟精子に対しては染色体異常につながる DNA 損傷を生ぜしめないものと思われる。また、かなりの高温に暴露されたにもかかわらず染色体異常が増加しなかったことから、精子には温度効果による異常誘発もないものと考えられる。

今回の照射は強いマイクロ波の急照射であったが、弱いマイクロ波を長時間照射した場合には異なる結果となる可能性は残っている。この実験はヒトの射精精子を用いた系では難しいので、動物実験による確認が必要である。

また、環境変異原の遺伝的影響は、精子形成過程の各段階（精原細胞、第 1・第 2 精母細胞、精細胞および精子）で大きく異なることが放射線や化学物質を用いた研究で明らかにされている。マイクロ波は、細胞としての代謝活性をもたない成熟精子では染色体異常を誘発しなかったが、細胞活性をもつ精原細胞～精細胞には細胞質内代謝系を介して間接的に異常を誘発する可能性がある。マイクロ波により誘発された染色体異常が温度効果によるものであるという可能性についてはすでに培養体細胞で指摘されている (Huang *et al.*, 1977; Alam *et al.*, 1978)。精原細胞～精細胞への影響に関する研究もヒトでは難しいので、動物実験による検討が必要である。

References

- Alam, M. I., Barthakur, N., Lambert, N. G. and Kasativa, S. S. 1978. Cytological effects of microwave radiation in Chinese hamster cells *in vitro*. *Can. J. Genet. Cytol.* **20**: 23-30.
- Baranski, S., Czerski, P. and Szmigielski, S. 1969. Microwave effects on mitosis *in vivo* and *in vitro*. *Genetica* **3**: 92-98.
- Fang, B. R., Lu, Q., Li, F. B., Zou, R. B. and Liu, Y. H. 1982. Application of microwave in male contraception. *Chin. J. Urol.* **3**: 75.
- Garaj-Vrhovac, V., Horvat, D., Brumen-Mahovic, V. and Racic, J. 1987. Somatic mutations in persons occupationally exposed to microwave radiation. *Mutation Res.* **181**: 321 (Abstract).
- Garaj-Vrhovac, V., Horvat, D. and Koren, Z. 1991. The relationship between colony-forming ability, chromosome aberrations and incidence of micronuclei in V79 Chinese hamster cells exposed to microwave radiation. *Mutation Res.* **263**: 143-149.
- Huang, A. T., Engle, M. E., Elder, J. A., Kinn, J. B. and Ward T. R. 1977. The effect of microwave radiation (2450 MHz) on the morphology and chromosomes of lymphocytes. In: *Biological Effects of Electromagnetic Waves*, Justesen, D. R. and Guy A. E. (Eds.), U.S. Department of Health Education and Welfare, Washington, D. C., pp. 173-177.
- Kamiguchi, Y. and Mikamo, K. 1986. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.* **38**: 724-740.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. 1990a. Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after *in vitro* exposure to tritium β -rays. *Mutation Res.* **228**: 125-131.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. 1990b. Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated *in vitro*. *Mutation Res.* **228**: 133-140.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H. and Mikamo, K. 1994a. Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans. *Congenit. Anom.* **34**: 1-12.
- Kamiguchi, Y., Tateno, H., Iizawa, Y. and Mikamo, K. 1994b. Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents *in vitro*. *Mutation Res.* in press.
- Leboritz, R. M., Johnson, L. and Samson, W. K. 1987. Effects of pulse modulated microwave radiation and conventional heating on sperm production. *J. Appl. Physiol.* **62**: 245.
- Lloyd, D. C., Saunders, R. D., Finnon, P. and Kowalczyk, C. I. 1984. No clastogenic effect from *in vitro* microwave irradiation of G₀ human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* **46**: 135-141.
- McRee, D. I. and MacNichols, G. 1981. Incidence of sister chromatid exchange in bone marrow cells of the mouse following microwave exposure. *Radiation Res.* **85**: 340-348.
- Mikamo, K. and Kamiguchi, Y. 1983. A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In: *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Ishihara, T. and Sasaki, M. S. (Eds.), Alan R. Liss, New York, pp. 411-432.
- Sarkar, A., Ali, S. and Behari, J. 1994. Effect of low power microwave on the mouse genome: A direct DNA analysis. *Mutation Res.* **320**: 141-147.
- Yao, K. T. S. and Jiles, M. M. 1970. Effects of 2450 MHz microwave radiation on cultivated rat kangaroo cells. In: *Biological Effects and Health Implications of Microwave Radiation*, Cleary S.F. (Ed.), U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D. C., pp. 123-132.

Effects of Microwave Irradiation on Human Sperm Chromosomes¹⁾

Yujiroh KAMIGUCHI*, Hiroyuki TATENO*, Seiji WATANABE* and Yasuko TONOMURA

Abstract

This study was undertaken to examine the cytogenetic effects of microwaves on human spermatozoa, using an interspecific *in vitro* fertilization system between human spermatozoa and zona-free hamster oocytes.

Ejaculated human spermatozoa were exposed *in vitro* to microwaves from a household electronic range (2.45 GHz, 500 W) for 5 (Group I) and 10 seconds (Group II). The average temperatures of the sperm suspensions were 29°C in the non-irradiated control, 38°C in Group I, and 54°C in Group II immediately after the microwave irradiation. After irradiation, about 10% of the spermatozoa became immotile in Group I, as did about 50% of the spermatozoa in Group II, due to the heat stress.

A total number of 474 spermatozoa were karyotyped in the control: 386 spermatozoa, in Group I, and 506 spermatozoa, in Group II. The incidences of spermatozoa with structural chromosome aberrations were $11.3 \pm 1.4\%$, $11.5 \pm 1.6\%$ and $10.3 \pm 2.0\%$ in the control and Groups I and II respectively, showing no statistically significant difference between the three groups. The numbers of aberrations per spermatozoon were 0.140 ± 0.023 , 0.127 ± 0.027 , and 0.123 ± 0.028 respectively in the three groups, also showing no significant difference between them.

These results indicate that neither microwave irradiation nor heat stress has a clastogenic effect on human sperm chromosomes.

¹⁾ Supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (Y. Tonomura, No. 06680517).

* Department of Biological Sciences, Asahikawa Medical College.